

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年7月22日 (22.07.2004)

PCT

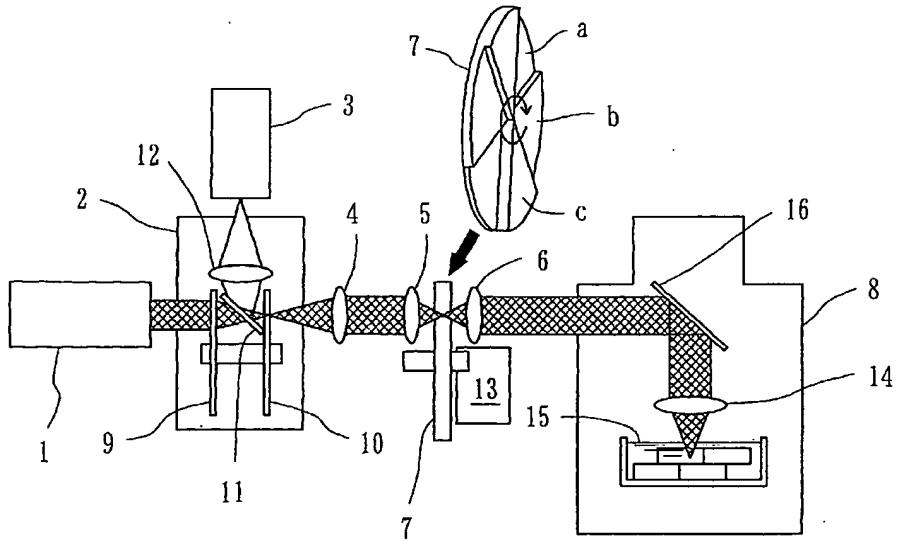
(10)国際公開番号
WO 2004/061515 A1

- (51)国際特許分類⁷: G02B 21/06, 21/14, 21/36 [JP/JP]; 〒600-8815 京都府 京都市下京区 中堂寺粟町 93番地 Kyoto (JP).
- (21)国際出願番号: PCT/JP2003/016641
- (22)国際出願日: 2003年12月24日 (24.12.2003)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願 2002-379869 2002年12月27日 (27.12.2002) JP
特願2003-337105 2003年9月29日 (29.09.2003) JP
- (72)発明者: および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 高松 哲郎 (TAKAMATSU,Tetsuro) [JP/JP]; 〒603-8802 京都府 京都市北区 西賀茂上庄田町 5-38 Kyoto (JP). 藤田 克昌 (FUJIITA,Katsumasa) [JP/JP]; 〒567-0888 大阪府 茨木市 駅前 1-2-22 カサベルデ 310号室 Osaka (JP).
- (74)代理人: 武石 靖彦, 外 (TAKEISHI,Yasuhiko et al.); 〒604-0835 京都府 京都市中京区御池通高倉西入高宮町 200番地 千代田生命京都御池ビル 8階みのり特許事務所 Kyoto (JP).
- (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

/統葉有/

(54) Title: MULTILAYER OBSERVATION OPTICAL MICROSCOPE AND MULTILAYER OBSERVATION UNIT

(54)発明の名称: 多層観察型光学顕微鏡及び多層観察ユニット



(57) Abstract: In an optical microscope, a pair of convergence/collimation lenses (5, 6) are arranged in the common optical axis of a light beam directed toward a sample (15) being observed through an objective lens (14) and a light beam radiated or reflected from the sample to pass through the objective lens reversely. A means (7) for varying the phase of the transmitting light within a specified range is provided between these lenses so that the sample is irradiated while being focused at a depth corresponding to the phase at the wave front of the light beam entering the objective lens.

(57) 要約: 光学顕微鏡において、対物レンズ (14) を通して被観察試料 (15) に照射される光線と、同試料から放射又は反射されて対物レンズを逆向きに通過した光線との共

/統葉有/

WO 2004/061515 A1



HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

通光軸中に、収束／規準化レンズ対(5, 6)を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を所定の範囲内で変化させるための位相変更手段(7)を設けたことにより、対物レンズに入射する光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点照射するように構成したものである。

明細書

多層観察型光学顕微鏡及び多層観察ユニット

技術分野

本発明は光学顕微鏡、特にリアルタイムにおいて三次元的に被観察試料の動態を観察することが可能な多層観察型光学顕微鏡、及びこれらの顕微鏡に使用可能な多層観察ユニットに関するものである。

発明の背景

顕微鏡一般は焦点整合により被観察試料面の深さに対応するものであり、特に共焦点顕微鏡は光軸方向に優れた分解能をもち、三次元構造を有する標本の光学的切片像を観察できるため、医学及び生物学の分野において近年急速に普及した光学的観察手段である。その原理的構成は、図5に示すように、レーザー光源1から出たレーザービームを、例えば、二重回転板2（後に詳述する）におけるレンズアレーディスク9のマイクロレンズで収束し、ダイクロイックミラー11を透過させて、もう一方の回転板であるニポウディスク10のピンホール中に合焦・出射し、更に対物レンズ14を介して被観察体に照射し、それにより励起発光した蛍光を観測用光線として折り返し経路に乗せ、同一のピンホールを通して（所謂、共焦点で）計測するものである。

この計測はピンホール通過後の蛍光を、ダイクロイックミラー11で反射し、凸レンズ12で収束させて高速CCDカメラ3に入射されることにより行われる。このような共焦点顕微鏡により生態組織を観察する場合、被観察体がマウス等であれば、その摘出心20等をカニューレ21を用いて灌流し、心電図計測装置22でモニターしながら被観察部位にレーザービームを照射して行うことも、ある程度は効果的に実施される。

しかしながら、共焦点顕微鏡はその光軸方向の高分解能性の故に、生きた細胞や組織の三次元像をリアルタイムで捕らえるには、深さの異なるレベルを多層的に観察する必要があり、これまでには標本ステージや対物レンズといった重量のあるものを動かさなければ成らなかったため〔例えば、特許文献1（特開平06-341955号公報）、及び非特許文献1（オリンパス光学工業（株）カタログ、「走査型レーザ顕微鏡」2002年9月30日検索、インターネットURL:<http://www.nagano-it.go.jp/seimitu/setubi/se-shuuseki10/se-04laser.html>（仕様の欄））参照〕、リアルタイムでの三次元観察は不可能であった。

発明の開示

本発明の基本目的は、上記のような従来の共焦点レーザ顕微鏡を含む光学顕微鏡システムにおける三次元走査の困難性を光学的に解決した光学系構造を提供することにある。

本発明の更なる目的は、生きた組織細胞の三次元的な動態をも高速に蛍光顕微鏡観察できる光学系構造を提供することにある。

上記の目的を達成するための、第1の発明は、対物レンズに対し、そのレンズから被観察試料に入射すべき照射光線を入射させる光軸中に、収束／視準化レンズ対を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段を設けたことにより、対物レンズに入射する照射光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点照射するようにした光学顕微鏡を構成したものである。

上記の基本構成によれば、位相変更手段を経て視準化レンズを出た照射光線の波面は、視準化レンズに向かう位相変更手段の状態ごとに、光軸からその光軸を横断する面内における周辺にかけて生ずる位相変位の度合が相違し、その位相変位度が大きければ、更に対物レンズに入射して結ばれる焦点の深度がそれに応じて深くなる。この深度変化の幅は、照射光線の波長に応じて広くできるが、本発

明では可視波長域で $100 \mu m$ 程度まで可能である（使用する対物レンズの N.A., 倍率に依存する）。

更に、上記の目的を達成するための、第 2 の発明は、前記収束／視準化レンズ対を配置する光軸が、共焦点顕微鏡において、対物レンズを通して被観察試料に照射される照射光線と、同試料から放射されて対物レンズを逆向きに通過した観測用光線との共通光軸からなるように構成したものであり、上記第 1 の発明の技術的効果は、この共焦点顕微鏡において最もよく発揮される。

観測用光線とは、被観察試料の情報を含んだ光線であり、照射光線により励起された蛍光線あるいは反射光である。

更に、上記の目的を達成するための、第 3 の発明は、上記の基本構成における位相変更手段が、段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを配列し、各セグメントが順次光軸を横切るように設置された回転板からなるようにしたものである。

第 4 の発明によれば、この回転板からなる位相変更手段は、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の厚さを段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめることができる。

更に、第 5 の発明によれば、この回転板からなる位相変更手段は、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の屈折率を段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめることができる。

前述した更なる目的を達成するための、第 6 の発明は、本発明を適用する光学顕微鏡の試料台の二次元走査と、前記位相変更手段の位相走査とを同期させることにより、被観察試料の三次元動態を観察できるようにしたものである。これにより、蛍光観察光路の終端に配置された CCD カメラ、例えば、既存の撮像速度 1000 フレーム／秒の、インテンシファイド高速 CCD カメラ等によれば、生きた組織の三次元的動態などをも、高速に観察することが可能となる。

更に、標本ステージあるいは対物レンズの移動による第 1 の光軸方向観察位置

制御手段と、対物レンズに対しそのレンズから被観察試料に入射すべき照射光線を入射させる光軸中に配置された収束／視準化レンズ対と、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段とからなる第2の光軸方向観察位置制御手段とを設けることにより、深い光軸方向の被観察試料の観察を可能にすると共に、光軸方向の観察を早い時間で詳細に観測することができる。更に、光学顕微鏡の試料台への試料光線の二次元走査と第1の光軸方向観察位置制御手段と第2の光軸方向観察位置制御手段とを同期させることにより、被観察試料の三次元観察を深く且つ特定領域を局部的に詳細に観察することができる。同期して得られた情報を三次元画像にするためには、事前に第1の光軸方向観察位置制御手段と第2の光軸方向観察位置制御手段との各々の制御長を規格化しておくことにより可能になる。また、第1及び第2の光軸方向観察位置制御手段の各々の制御長を規格化しておくことにより、第2の光軸方向観察位置制御手段によって光軸方向の長さを早い時間で計測できる。即ち、対物レンズに対し、そのレンズから被観察試料に照射光線を入射させる光軸中に、収束／視準化レンズ対を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段を設けたことにより、対物レンズに入射する照射光線の波面の位相に応じた深度において、前記試料を合焦点照射するように構成した多層観察型光学顕微鏡を用いて、前記位相変更手段の第1の設定値により得られる第1の観察面を観察する工程と、前記位相変更手段の第2の設定値により得られる第2の観察面を観察する工程と、前記第1の観察面と第2の観察面との光軸方向の距離を前記位相変更手段の第1の設定値と前記位相変更手段の第2の設定値との差から測定することができる。

また、医学生物分野の試料及びエレクトロニクス分野の試料等の三次元検査方法が可能になる。即ち、光学的に三次元構造を有する被観察試料を作成する工程と、その被観察試料を標本ステージに設置する工程と、第6の発明の光学顕微鏡の構成を用いてその被観察試料の三次元デジタルデータを測定する工程と、試料

が正常な三次元形状と判断できる三次元の検査判定基準デジタルデータを設定する工程と、その測定された被観察試料の三次元デジタルデータと検査判定基準デジタルデータとを比較する工程とから、被観察試料が正常かどうかを判断することができる。繰り返し三次元データを測定することにより動態の検査も可能になる。

医学生物分野の試料の作製は、蛍光材料を試料に混入することにより光学的に鮮明に観察できる被観察試料を準備できる。エレクトロニクス分野の試料作成は、製造する基体表面に凹凸を形成する工程となる。

二次元データの判断のみならず、深さ方向のデータも含んだ三次元データによる検査が可能になる。半導体集積回路においてはますます表面構造が三次元化していくが、本発明の三次元検査方法により高速で検査できるようになる。

更に、第7の発明は、光路長変化によらない対物レンズの焦点深度調整を可能にする基本的構成として、段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを円周方向に順次隣接するように配列した回転板からなり、対物レンズへの入射光軸中に配置された収束／視準化レンズ対における両レンズ間に挿入することにより、前記位相板セグメントの各々が順次両レンズ間の光軸を横切る際に、各セグメントごとに透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内において、異なった度合いで変化させるべき位相変更手段として作用する多層観察ユニットであって、このユニットを経て対物レンズに入射する光線の波面の位相に応じて、その焦点深度を変更させるようにした多層観察ユニットを提供するものである。

本発明の多層観察型リアルタイム光学顕微鏡、特に共焦点顕微鏡によれば、細胞や生体組織の三次元構造を、そのままの状態で高精度に観察することができる。すなわち、多層的に観察できない従来の方法では、本来三次元的な生体組織の営みを、シャーレ内での細胞培養等により二次元平面に置き換えることで可視化しているに過ぎず、生体の自然な姿を捉えているとは言いがたいものであったのに対し、本発明では、生体の営みを高速且つ立体的に可視化したものだからである。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡の好ましい実施例を示す光学系構成図である。

図 2 は、図 1 の実施例の要部をなす多層観察ユニットの構成図であり (a) , (b) , (c) の順に焦点深度が深まっていく様子を示している。

図 3 は、実施例の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡において、(a) 最も浅い Z 1 レベル、(b) 中間 Z 2 レベル、(c) 最も深い Z 3 レベルにおいて、順次に二次元走査（光学断層像の撮影）を行い、三次元像を合成する手順を示す模式図である。

図 4 は、本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡により、実際の生体組織を観察する状態を示す模式図である。

図 5 は、従来の共焦点顕微鏡により、ラットの心臓組織を観察する状態を示す略図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、細胞組織等の三次元動態の高速観察を可能とする多層観察ユニットを構成したものである。顕微鏡全体の構成としては、すでに実用化されている二次元 (x-y) 平面を高速に観察する顕微鏡と、それに使用する光源（レーザー）との間に、前記多層観察ユニット（観察深さ： z 方向を多層的に変えて観察するユニット）を構成する位相変更手段としての光学位相板配列ディスクを挿入する形をとる。このユニットは順次異なった光学特性をもつ光学位相板のセグメント（円弧状片）をディスク状に配列構成し、回転することにより各セグメントが順次光軸を横切るように設置され、かくして高速に観察深さを変更し、各深さ（層）における二次元スライス像を得て組織細胞の三次元画像を構築・再現することができる。

適用可能な光学顕微鏡としては、共焦点顕微鏡のほか一般的な蛍光顕微鏡や二光子顕微鏡、その他対物レンズを用いて被観察試料に光照射する光学顕微鏡を用いることができ、以下の好ましい実施例においては最も効果的な共焦点顕微鏡について説明する。

本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡の好ましい実施例は、図1に示すとおりである。図1の光学系において、1はレーザー光源、2は二重回転円板式高速共焦点スキャナー、3はインテンシファイド高速CCDカメラ、4は高速共焦点スキャナー2のピンホールを出たレーザー光をコリメート、すなわち視準化する凸レンズ、5は収束レンズ、6は収束レンズ5から出て反転像化したレーザー光を視準化する第2の凸レンズであり、このレンズ5、6間に本発明の多層観察ユニット7を構成する位相変更手段としての光学位相板の配列ディスクが配置される。レンズ6から出た視準レーザー光は蛍光位相差顕微鏡ユニット8に入射するようになっている。

高速共焦点スキャナー2は、レーザー光源1側にマイクロレンズアレーディスク9を、コリメートレンズ4側に多数のピンホールが渦巻き状に配置された所謂ニポウディスク10を同軸・対向的に設置したものであり(図5参照)、当然ながらディスク9のマイクロレンズアレーも、ピンホールアレーに対応した渦巻き状であり、両ディスク9、10の高速回転により、例えば、最速で1000フレーム/秒で光軸をx-y走査することができる。

両ディスク9、10間には励起用レーザー光を透過し、観察試料から返ってきた蛍光を反射するダイクロイックミラー11が配置され、その蛍光反射光路中には凸レンズ12が配置され、CCDカメラ3の受光面に結像するようになっている。CCDカメラ3は高速共焦点スキャナー2に対応して最速で1000フレーム/秒で光軸をx-y走査画像を撮影することができる。

本発明の多層観察ユニット7は、図1の光学系内においては駆動用モーター13と共に、側面でのみ示しているが、その具体的構成例としては、図の上方に取

出して斜視図で示すように、光学特性の異なる複数の位相板セグメント a, b, c . . . をディスク状に配列したものである。光学特性がセグメントごとに段階的に異なる様としては、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜（当該斜視図においては区分図示していない）が同一膜物質から成る場合において、斜視図で拡大して示すように、その厚さを段階的に変化させるか、厚さは不变にして屈折率を段階的に変えるか、あるいはその両方の組み合わせを採用する。

多層観察ユニット7を通り、視準化レンズ6から出たレーザービームは、蛍光位相差顕微鏡ユニット8内の対物レンズ14に入射し、可変の深度において、ここでは模式的に示した通り、シャーレ等に収容された細胞・組織試料15内に焦点を結ぶようになっている。また、この場合は光学系構成の便宜上、顕微鏡ユニット8内には、対物レンズ14の前に平面ミラーからなる光路折り曲げ鏡16が配置される（図1参照）。

図2は、上述の光路折り曲げ鏡16を省略して、収束／視準化レンズ対5, 6間に配置された多層観察ユニット7の位相板により、対物レンズ14により結ばれる焦点が効果的に深度調整される手順を示す模式図である。ここに（a）は、多層観察ユニット7の光路中セグメントの位相板要素が最も薄いものであるとき、（b），（c）は順次それより厚くなった場合であり、レンズ5, 6間の基準中間結像面と各中間レベルを整合させて描いたものである。

図2（a）では、位相板要素が薄いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7（a）内に入り、光軸と交差してから同要素7（a）を出るまでの距離が比較的短くなり（したがって光軸通過部との距離差も短くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）は比較的小さい。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の最上位Z1となる。

図2（b）では、位相板要素が（a）より少し厚いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7（b）内に入り、光軸と交差してから同要素7（b）を

出るまでの距離がやや長くなり（したがって光軸通過部との距離差もやや長くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）もやや長くなる。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の次のレベル（ここでは中間位）Z2となる。

図2（c）では、位相板要素が（b）より更に厚いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7（c）内に入り、光軸と交差してから同要素7（c）を出るまでの距離が更に長くなり（したがって光軸通過部との距離差も更に長くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）も更に長くなる。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の更に次のレベル（ここでは最下位）Z3となる。

以上のことから、本発明の実施例においては、多層観察ユニット7の位相板要素がセグメントa、b、c、・・・と変位するごとに厚くなるため、対物レンズ14の対物面における光軸点から周縁部にかけて出射する波面の合焦点の深度は、効果的に十分な距離を変位することが理解できるであろう。また、この深度変位は、前述の実施例のごとく、多層観察ユニット7における各位相板セグメント要素（等方性透明膜）の厚さが段階的に変化する場合のほか、厚さは不变にして屈折率を段階的に変える場合、あるいはその両方の組み合わせを採用する場合にも生ずることは明らかである。

図3は、本発明の高速共焦点顕微鏡により観察深度を順次変更しながら、光学断層像を計測し、これらを合成する画像処理により、リアルタイム三次元像を得る手順原理を示す模式図である。図3（a）では、図2（a）の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ1において観察試料を二次元走査し、図3（b）では、図2（b）の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ2において観察試料を二次元走査し、更に図3（c）では、図2（c）の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ3において観察試料を二次元走査したものである。

各レベルにおいて描いた複数の線 18 は、図 1 に示した高速共焦点スキャナー 2 の二重板 9、10 におけるマイクロレンズ／ピンホールアレイの本数に応じて形成される走査線であり、19 はその走査線上においてレーザービーム 17 が結ぶ焦点である。かくして、これらの合焦点レーザービームによりその試料点から励起・発光した蛍光のうち、往路のレーザービームと同様の経路を逆にたどる蛍光が、多層観察ユニット 7 により、同じく波面位相を調整され、高速共焦点スキャナー 2 のニポウディスク 10 における光軸位置のピンホールを通り、ダイクロイックミラー 11 によって反射され、凸レンズ 12 を通って高速CCDカメラ 3 により受光及び撮像処理されることは前述した通りである。

実施例において、図 3 (a) ~ (c) の過程は、好ましくは 1/30 秒程度で行われ、高速CCDカメラ 3 で画像取得後三次元像として合成される。例えば、1 秒間 1000 フレームの高速CCDカメラを用いて 3 層の三次元観察を行う場合、1 秒間に $1000 / 3 = 333.3$ の立体像が得られる。

図 4 は、生体の左心室 23 及び左冠状動脈組織における心筋梗塞巣 24 の細胞を、本発明のリアルタイム共焦点顕微鏡によりリアルタイムで観察するため、カテーテル等、何らかの方法でレーザー励起した場合の模式図である。共焦点顕微鏡のレーザー光路先端（対物レンズ）25 から出たレーザービーム 17 は前述の態様にしたがって多層的に二次元走査され、この領域 24 の細胞が三次元画像によりリアルタイムで観察され、例えば、壞疽を生じていること等が容易に発見できるようになる。なお、26 は心房、27 は大動脈である。

また、標本ステージあるいは対物レンズを光軸方向に移動することによって左心室 23 全体も観察できる。標本ステージあるいは対物レンズの光軸方向の移動距離と多層観察ユニットによる焦点移動距離を規格化すると共に、同期化して観察することにより、図 4 のように広範囲な観察と局所的な詳細観察とを重ねて三次元観察することができる。

標本ステージあるいは対物レンズの光軸方向の移動距離と多層観察ユニットに

による焦点移動距離を規格化することにより、早い時間で被観察試料の光軸方向の深さを測定することもできる。移動距離を規格化する別な方法としては、すでに深さ方向の距離が測定済みの基準試料を事前に観察することにより、多層観察ユニットによる焦点移動距離を規格化することもできる。観察できる観察面と多層観察ユニットによる焦点移動距離の差を測定することにより、その異なる観察面の深さを測定できる。深さを測る場合には、多層観察ユニットとしてアナログ的に光軸方向の焦点移動距離を制御できる位相変更手段が好ましい。位相変更手段として印可電界によって制御できるポッケルス効果あるいはカー効果を持った電気光学結晶デバイスを用いることによりアナログ的に光軸方向の焦点移動距離を制御することができる。ポッケルス効果を有する材料としては例えばLiNbO₃（ニオブ酸リチウム）結晶がある。カー効果を示す材料としては液体であるがCS₂がある。本発明の顕微鏡は、三次元観察及び測長を早い時間で同時にできる。従って、実験用だけではなくマイクロデバイス等の生産段階での検査工程に最適である。

また、多層観察ユニットの収束／視準化レンズの倍率を変えることにより光軸方向の移動距離範囲を広くできる。被観察試料の大きさに応じて多層観察ユニットの収束／視準化レンズの倍率を変えることにより、被観察試料を1回の走査で三次元観察することができる。収束／視準化レンズの倍率を変える構造を設けたことにより、位相変更手段の少ない位相変化でも効果的に移動距離範囲を光学的移動距離範囲を広くできる。言い換えれば、多層観察ユニットを小型化することができる。この位相変更手段の小型化は位相変更の高速化を容易にする。

更に、高速に三次元観察ができるので、医学生物分野の試料及びエレクトロニクス分野の試料の三次元検査が可能になる。即ち、まず、光学的に三次元構造を有する被観察試料を作製する。例えば、医学生物分野の試料の作製は、蛍光材料を試料に混入することにより光学的に鮮明に観察できる被観察試料を準備する。半導体集積回路等のエレクトロニクス分野の試料作製において、製造されるシリ

コンウェハ表面は一般的にエッティング等で凹凸が形成される。凹凸の深さの絶対値を含めて正常かどうかを判断したいという、その被観察試料を標本ステージに設置する。本発明の光学顕微鏡の構成を用いて、その被観察試料の三次元デジタルデータを測定する。被観察試料が正常な三次元形状であるか否か判断するためには、別途正常な三次元形状の試料を観察して得られたデジタルデータを検査判定基準デジタルデータとして設定しておく。測定された検査用の被観察試料の三次元デジタルデータと検査判定基準デジタルデータとを比較することにより、被観察試料が正常かどうかの判定をすることができる。繰り返し三次元デジタルデータを測定することにより、時間的に変化する動態の検査も可能になる。この動態検査の場合には、三次元データ走査を正確な時間で同期して評価することにより可能になる。動態の検査は、時間と共に変化する検査判定基準三次元デジタルデータを検査前に設定しておく必要がある。

従来のシリコンウェハの集積回路のパターン検査は、二次元的デジタルデータの判断が一般的であった。本発明の検査方法によれば、深さ方向のデジタルデータも含んだ三次元デジタルデータによる検査が可能になる。半導体集積回路においては、ますます表面構造が三次元化していくが、本発明の顕微鏡を用いて三次元検査を高速でできるようになる。医療分野においても、多くの試料を早く検査する必要がある健康診断のような用途に用いることが可能になる。

産業上の利用の可能性

以上述べたとおり、本発明の多層観察型リアルタイム光学顕微鏡、特に共焦点顕微鏡によれば、細胞や生体組織の三次元構造を、そのままの状態で高精度に観察することができる。すなわち、多層的に観察できない従来の方法では、本来三次元的な生体組織の営みを、シャーレ内での細胞培養等により二次元平面に置き換えることで可視化しているに過ぎず、生体の自然な姿を捉えているとは言いがたいものであったのに対し、本発明では、生体の営みを高速且つ立体的に可視化

したものだからである。

上記のような本発明の技術的効果は、その観察結果から、これまで見えなかった多くの情報をもたらすであろう。それはまた医学・生物学、並びに関連諸分野において、きわめて有用であるものと期待される。

更に、本発明のリアルタイム光学顕微鏡の製作に当たっては、従来の光学顕微鏡の対物レンズ直前光路中に、前述した多層観察ユニットを挿入するだけでよいため、比較的低コストで実施可能であり、その産業上の利点もまた極めて大きいものがある。

請求の範囲

1. 対物レンズに対し、そのレンズから被観察試料に照射光線を入射させる光軸中に、収束／視準化レンズ対を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段を設けたことにより、対物レンズに入射する照射光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点照射するように構成したことを特徴とする多層観察型光学顕微鏡。

2. 前記収束／視準化レンズ対を配置する光軸が、共焦点顕微鏡において、対物レンズを通して被観察試料に照射する照射光線と、同試料から放射あるいは反射されて対物レンズを逆向きに通過した蛍光線との共通光軸であることを特徴とする請求項1に記載の多層観察型光学顕微鏡。

3. 前記位相変更手段が段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを配列し、各セグメントが順次光軸を横切るように設置された回転板からなることを特徴とする請求項1又は2に記載の多層観察型光学顕微鏡。

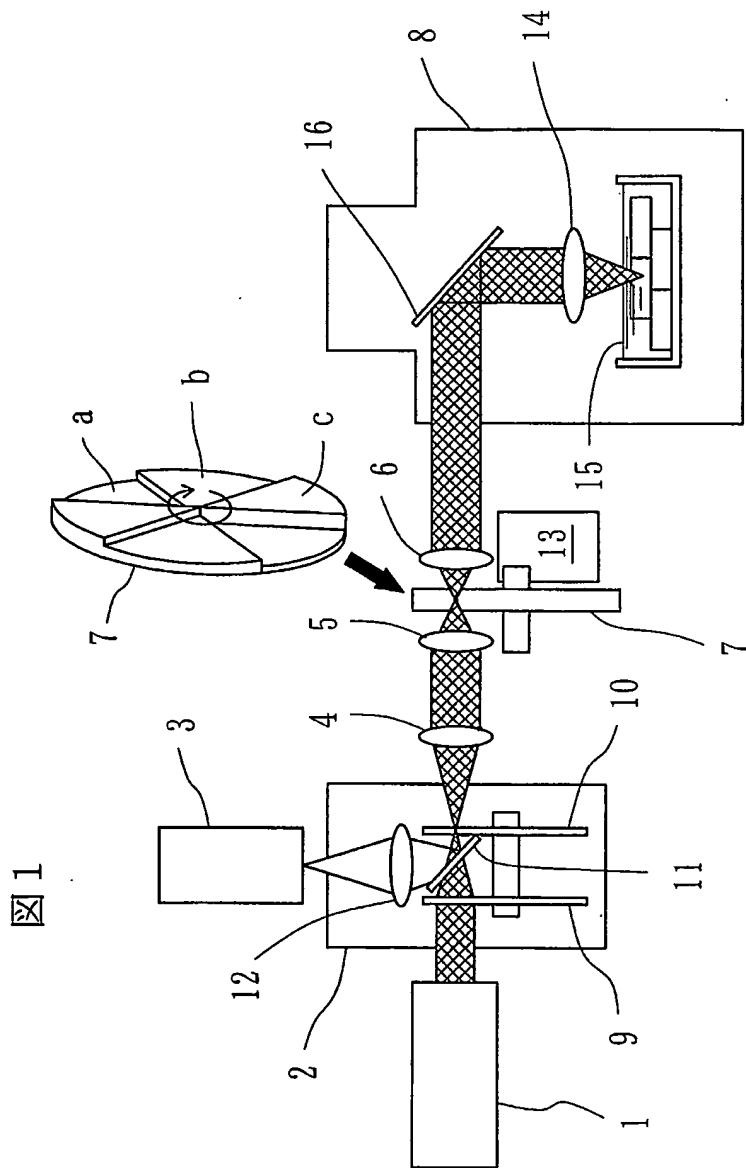
4. 前記位相変更手段が各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の厚さを段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめたことを特徴とする請求項3に記載の多層観察型光学顕微鏡。

5. 前記位相変更手段が各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の屈折率を段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめたことを特徴とする請求項3に記載の多層観察型光学顕微鏡。

6. 光学顕微鏡の試料台の二次元走査と、前記位相変更手段の位相走査とを同

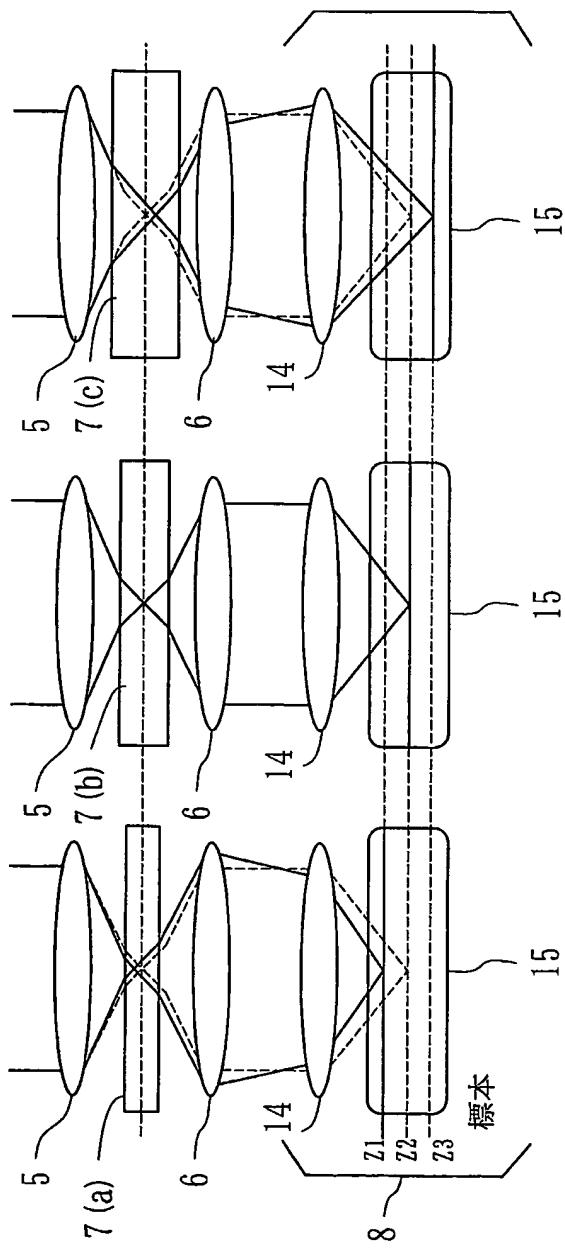
期させることにより、被観察試料の三次元動態を観察できるようにしたことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の多層観察型光学顕微鏡。

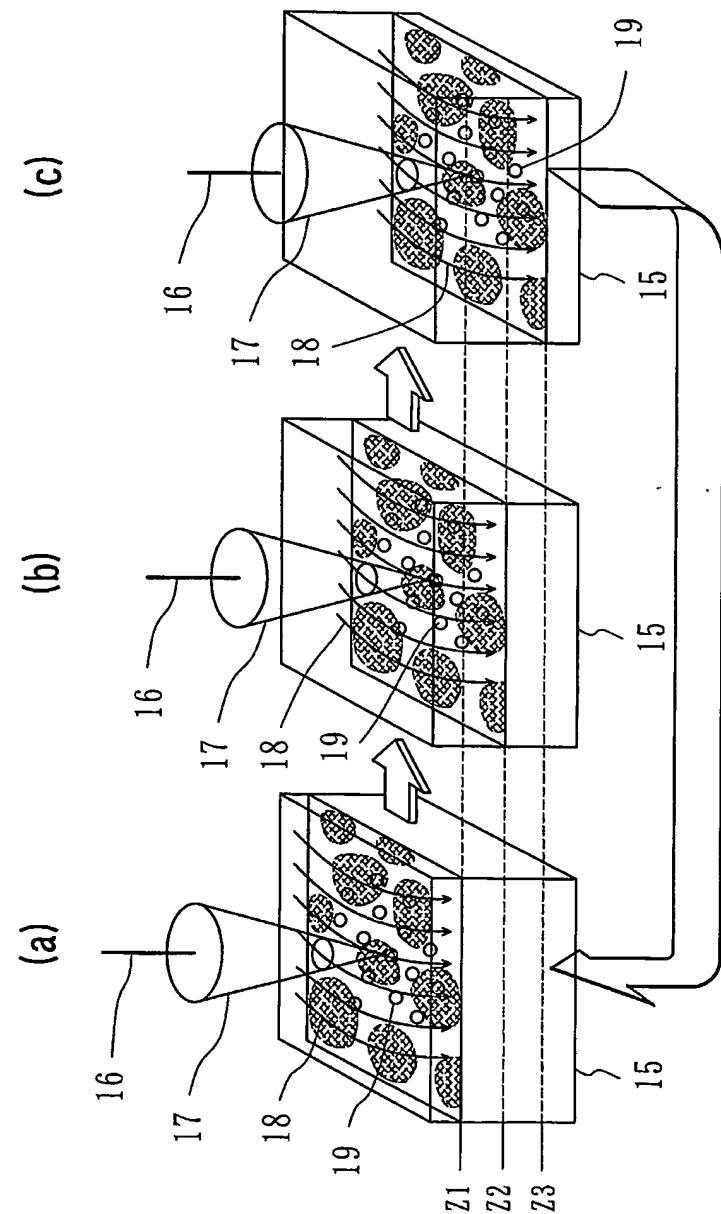
7. 段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを円周方向に順次隣接するように配列した回転板からなり、対物レンズへの入射光軸中に配置された収束／視準化レンズ対における両レンズ間に挿入することにより、前記位相板セグメントの各々が順次両レンズ間の光軸を横切る際に、各セグメントごとに透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内において、異なった度合いで変化させるべき位相変更手段として作用する多層観察ユニットであって、このユニットを経て対物レンズに入射する光線の波面の位相に応じて、その焦点深度を変更させるものであることを特徴とする多層観察ユニット。



2/5

図2 (a) (b) (c)





3

4/5

図 4

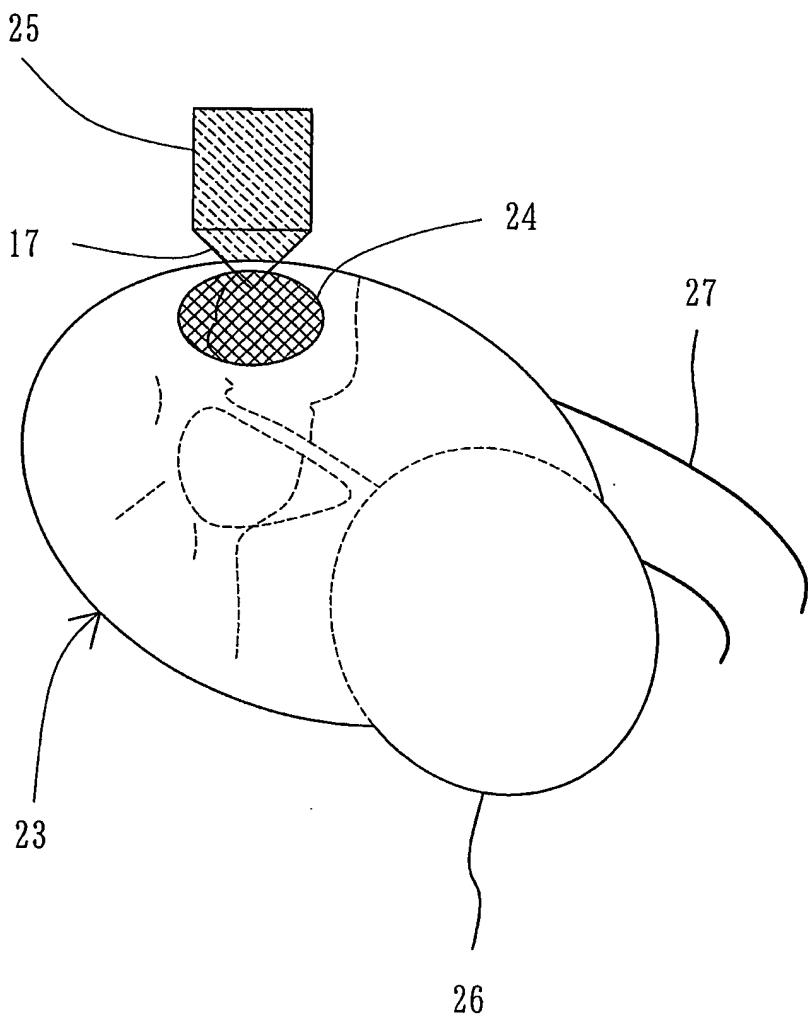
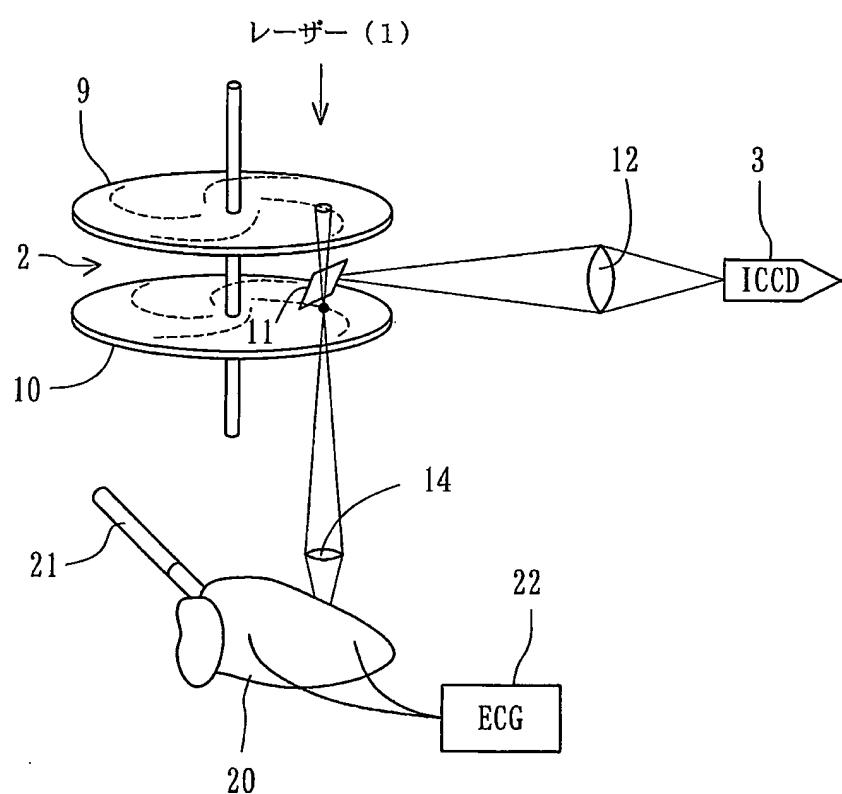


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G02B21/06, 21/14, 21/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G02B19/00-21/0014, G02B21/06-36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 8-136810 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 31 May, 1996 (31.05.96), Full text; all drawings (Family: none)	1, 3-5, 7 2, 6
Y	JP 11-38324 A (Nikon Corp.), 12 February, 1999 (12.02.99), Full text; all drawings (Family: none)	2, 6
Y	US 6094300 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 25 July, 2001 (25.07.01), Page 22, column 13, lines 23 to 32; Figs. 8, 9 & JP 10-206742 A	2

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search 31 January, 2004 (31.01.04)	Date of mailing of the international search report 10 February, 2004 (10.02.04)
------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16641

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-287035 A (Leica Microsystems Heidelberg GmbH.), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text; all drawings & DE 10105391 A1	2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G02B21/06, 21/14, 21/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G02B19/00-21/0014, G02B21/06-36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 8-136810 A (浜松ホトニクス株式会社)	1, 3-5, 7
Y	1996. 05. 31, 全文全図 (ファミリーなし)	2, 6
Y	JP 11-38324 A (株式会社ニコン) 1999. 02. 12, 全文全図 (ファミリーなし)	2, 6
Y	US 6094300 A (Olympus Optical Co., Ltd.) 2001. 07. 25, Page 22 column 13 lines 23-32, Fig 8, Fig 9 & JP 10-206742 A	2

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願目前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31.01.2004	国際調査報告の発送日 10.2.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 里村 利光 2V 9314
	電話番号 03-3581-1101 内線 3271

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 2002-287035 A (ライカ ミクロジュステムス ハイデルベルク ゲーエムベーハー) 2002.10.03, 全 文全図 & DE 10105391 A1	2